



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

**Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării**

(21) Nr. cerere: **94-01493**

(22) Data de depozit: **05.03.1993**

(30) Prioritate: **09.03.1992 US 847908;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.10.2000 BOPI nr. **10/2000**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 93 / 01898 05.03.1993**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 93/18142 16.09.1993**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**EP 0465024; Nature, vol. 33, 30 iunie
1988, (pag.866...869)**

(71) Solicitant: **WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, PULLMAN
99164-1802, US;**

(73) Titular: **WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, PULLMAN
99164-1802, US;**

(72) Inventatori: **LOVERINE P. TAYLOR, PULLMAN, WASHINGTON, US; YINYUAN MO,
PULLMAN, WASHINGTON, US;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER
TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI**

(54) **METODĂ DE REGLARE A FERTILITĂȚII PLANTELOR**

(57) **Rezumat:** Invenția prezintă o metodă de reglare a fertilității plantelor, care cuprinde blocarea producerii flavonolilor sau a activității acestora, la sediul localizării polenului, în scopul obținerii unei plante condiționat androsterile, urmată de refacerea activității flavonolilor pentru a salva capacitatea de germinare

și de creștere a polenului în plante. Blocarea producerii flavonolilor se realizează prin inhibarea producerii sau inactivarea unei enzime din ciclul de biosinteză a flavonolilor, selectată dintre flavanon-3-hidroxilază și chalcon-sintază.

Revendicări: 6
Figuri: 6

RO 116095 B1



Invenția se referă la o metodă de reglare a fertilității plantelor, în vederea aplicării în agricultură.

Se cunoaște că fertilizarea cu succes la plantele mai înalte este esențială nu numai pentru perpetuarea speciilor, ci și pentru că ea asigură totodată mari populații care reprezintă sursa de varietate și competiție care conduce la selecția naturală. În faza post-dispersală a dezvoltării gametofitului mascul, polenul germinază pe stigmat, care scoate în afară un tub, printr-un por de germinare din peretele polenului. La angiosperme, tubul de polen care crește este un canal pentru migrarea celor două celule spermatice prin țesutul stilar către sacul embrional unde ele fuzionează cu ovulul sau cu celulele centrale pentru a forma zigotul și, respectiv, endosperma (E.G. Cutter, 1978, *Anatomia Plantelor, Partea 1, Experimentare și interpretare*, N.Arnold, Eds., Addison Wesley, Londra, cap.6.). Dezvoltarea polenului are loc în anteră și la maturitate fiecare grăunte este un spor multi-celular conținând produse, atât ale expresiei genei sporofitice, care apare din stratul interior al peretelui anterei (tapetum), cât și ale expresiei genei haploide din celula vegetativă din fiecare grăunte (J.P.Mascarenhas, 1989, *Celula plantei 1*: 657; J.P. Mascarenhas, 1990, *Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol Biol.* 41:317). Deși procesul microsporogenezei este bine documentat din punct de vedere histologic, se cunoaște puțin în ceea ce privește factorii moleculari și biochimici care sunt implicați în funcția post-dispersală a polenului.

De asemenea, se cunoaște că flavonoizii reprezintă o clasă abundentă de metaboliți specifici plantelor, cu greutate moleculară mică (aproximativ 300), care au o structură generală având 15 atomi de carbon. Modificarea structurii de bază conduce la o serie extinsă de compuși, care sunt clasificați după starea de oxidare și modul de substituție la diferitele inele ale ciclului. Unele clase sunt pigmenți (de exemplu, antociani, chalcone, și, în mod special, flavonoli și flavone), în timp ce alte clase reprezintă compuși incolori ce absorb lumina ultra-violetă. Antocianii, în mod special, pelargonina, cianidina și delfinidina sunt responsabili în ceea ce privește coloritul plantelor (roșu, albastru și violet). Alți flavonoizi de pigmentare - chalconele - precum și unii flavonoizi și flavone, contribuie în mod semnificativ la coloritul florilor în galben, ivory sau crem. Flavonoizii polenului au fost identificați în numeroase specii, în care ei conferă o culoare galbenă distinctivă, polenului și pot reprezenta un procent considerabil (2 - 5%) din greutatea în stare uscată (R.Zerback, M.Bokel, H.Geiger, D.Hess, 1989, *Phytochemistry*, 28:897; R.Wlierinan și K.Viteh, 1983 *Protoplasma* 118:230). Se cunoaște că grăuntele de polen este un mediu special în ceea ce privește biosinteza și/sau acumularea flavonoidului, întrucât diferitele specii de plante au tipuri unice de flavonoizi în polenul lor (O.Ceska și E.D. Styles, 1984, *Phytochemistry* 23:1822).

Din literatură se cunosc plante având pigmentarea flavonoidă modificată, de exemplu, un mutant al porumbului care produce un polen nefuncțional de culoare albă în loc de culoare galbenă, așa cum a fost izolat și caracterizat anterior (Coe E. H., McCormick S.M. și Modena S.A., 1981, "Polen alb în porumb", *J.Hered* 72:318-320). Mutantul de polen alb răspândește în mod normal cantități de polen nepigmentat, care germinază pe mătase, dar nici o sămânță nu încolțește după mai multe polenizări. Starea este determinată pe cale sporofită de expresia mutațiilor regresive stabile a două gene chalcone sintaze (CHS) din porumb, C2 și Wnp. Recent, a fost raportată introducerea transgenei mediată într-o tulpină de petunia pigmentată

rezultată din încrucișări selective, pentru a reprima expresia genei endogene chs, care rezultă în corolele florilor, lipsind complet pigmentarea flavonoidă (Napoli C, Lemieux C. și Jorgensen R. 1990, "Introducerea genei chalcon sintaza chimerică în petunia conduce la co-reprimarea genelor omoloage *in trans*", *Plant Cell* 2: 279-289). Întrucât expresia transgenei CHS este, de asemenea, reprimată în aceste plante, termenul de co-reprimare a fost utilizat pentru a descrie acest fenomen (Jorgensen R., 1990, "Expresia modificată a genei în plante ca urmare a interacțiunii *trans* dintre genele omoloage", *Trends Biotech* 8: 340 - 344). Transgena integrată acționează ca un inhibitor nereticulat dominant al genei endogene CHS și conduce la o blocare completă a producerii pigmentilor flavonoizi vizibili nu numai în petalele florilor, ci și în organele reproductive.

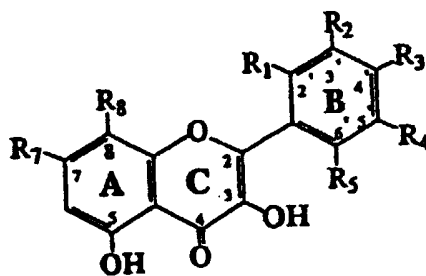
Blocajul expresiei genei CHS rezultă nu numai din deficiențe de pigmentare flavonoide, ci și în plante care nu sunt fertile (Coe și alții, 1981; Taylor și alții, 1992, "Fertilitate condiționată de parte bărbătească în *Petunia* deficientă în chalcon sintază", *J. Hered* 83:11-17). Se dorește foarte mult salvarea fertilității la plantele deficiente în ceea ce privește CHS pentru a se permite în continuare reglarea fertilității plantei prin controlul unei enzime mai strâns legate de fertilitatea polenului decât CHS.

S-a descoperit acum că plantele în care activitatea flavonon - 3 - hidroxilazei (F3H) a fost deteriorată într-o manieră care produce o deficiență în flavonol sunt fertile condiționat de parte bărbătească (CHF) și că fertilitatea de parte bărbătească poate fi salvată sau restaurată prin asigurarea condițiilor în care polenul plantelor poate fi contactat cu flavonoli de restaurare a fertilității. Activitatea F3H poate fi deteriorată prin blocarea producției de F3H în plante, direct sau indirect, de exemplu prin inactivarea F3H produsă pe cale naturală în plante sau prin deteriorarea activității unui precursor al enzimei, cum ar fi, chalcon sintaza (CHS) în desfășurarea biosintezei flavonolului. Deși, polenul viabil este produs de plante deficiente în F3H, germinarea polenului și creșterea tubului sunt reduse în mod drastic atât *in vivo* cât și *in vitro*, conducând la plante care sunt andro-sterile. Totuși, asigurând condiții în care polenul plantelor poate fi contactat cu flavonoli de restaurare a fertilității, poate fi restaurată întreaga germinație a polenului și abilitatea de creștere a tubului plantelor. Condiții adecvate de restaurare a fertilității includ orice condiții în care flavonolii necesari sunt făcuți disponibili polenului plantelor, incluzând, de exemplu, înlăturarea condițiilor de deteriorare a F3H, restaurarea producției de F3H în plante și altele asemănătoare. În mod alternativ, fertilitatea plantelor poate fi salvată sau restaurată prin contactarea polenului plantelor cu o cantitate de flavonol, eficientă pentru a accelera germinația și/sau creșterea tubului polenului.

Metoda de reglare a fertilității plantelor, conform invenției, cuprinde blocarea producerii flavonolilor sau a activității acestora la sediul localizării polenului, în scopul obținerii unei plante condiționat androsterile, urmată de refacerea activității flavonolilor pentru a salva capacitatea de germinare și de creștere a polenului în plantă.

Blocarea producerii flavonolilor se realizează prin inhibarea enzimei corespunzătoare din ciclul de biosinteză a flavonolilor, selectată dintre flavonon -3 hidroxilază și chalcon sintază.

90 Flavonolii de restaurare a fertilității utilizabili includ compuși având formula corespunzătoare structurii generale:



100 în care: R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₇ și R₈ reprezintă hidrogen, hidroxil sau alcoxi având de la 1 până la 3 atomi de carbon. Sunt preferați, în mod special, flavonolii care includ, galangin, kampferol, izorhamnetin, quercetin și morin.

Prin aplicarea invenției se obține ca avantaj un control mai eficient al capacității fertile a plantelor, la nivelul intern al căilor biochimice implicate în polenizare.

105 Se prezintă, în continuare, invenția în detaliu, în legătură și cu fig. 1...6, care reprezintă:

- fig. 1, schema influenței sporofitice (liniile oblice) asupra dezvoltării microsporilor în chalconsintaza (CHS) plantelor heterozigote. Lipsa funcției CHS în sporofite este indicată de fundalul de culoare albă (fig. 1 A), iar prezența funcției CHS este reprezentată printr-un fundal de culoare neagră (fig. 1B);

110 - fig. 2A și 2B, aspectul fotografic al germinării polenului *in vitro* de la o specie de petunie rezultată din încrucișări selective V26 (fig. 2A) și de la o plantă O2425.1 deficientă în ceea ce privește CHS (fig. 2B), în care polenul din antere dehiscente proaspete a fost suspendat într-un mediu lichid și s-a fotografiat după o creștere timp de 6 h, la temperatura camerei. Fâșia din fig. 2A reprezintă 25 μm. Săgețile din fig. 2B indică tuburile de polen în încercarea de a germina;

115 - fig. 3, fotografia secțiunilor transversale ale anterelor identice din punct de vedere al dezvoltării de la o specie de petunia rezultată din încrucișări selective (coloana din stânga) și de la o plantă O2425.1 deficientă în ceea ce privește CHS (coloana din dreapta), care au fost recoltate, fixate, sădite, secționate transversal și marcate cu albastru de toluidină, așa cum este descris în exemplul 3. Fig. 3A indică secțiuni ale întregii antere imediat înainte de dehiscență, când anterele deficiente în ceea ce privește CHS sunt de culoare cafenie și încrețite. Fâșia, din fig. 3A reprezintă 200 μm. Fig. 3B indică secțiuni ale anterei, la 48 h, înainte de dehiscență, când anterele transgenice sunt umflate și de culoare albă. Fig. 3C indică secțiuni ale anterei ca și fig. 3A la mărirea reprezentărilor, din fig. 3B. Fâșia din fig. 3B reprezintă 50 μm. Fig. 3D indică un polen matur la dehiscență. În fig. 3, P reprezintă polen; E reprezintă endotecium; S reprezintă stonium; iar C reprezintă cuticula.

120 - fig. 4, fotografia restaurării germinării polenului și creșterii tubului la polenul de petunia, deficient în ceea ce privește CHS datorită flavonolului de restaurare a fertilității, kampferolul. Polenul a fost colectat de la antere fertile condiționat de parte bărbătească, suspendate în mediul de germinare, și la care s-a adăugat kampferol (E +, fig. 4C) sau dimetilsufoxid DMSO (K-, fig. 4B) la o concentrație finală, de 1 μmol. Zonele reprezentative ale polenului sunt fotografiate, la 4 h, de la incubatie. Germinarea și creșterea tubului observate la polenul fertil condiționat de parte bărbătească

135

în kampferol (fig. 4C) nu se pot distinge de tipul sălbatic V26 de control (C, fig. 4A), care a primit doar DMSO. Polenul nesuplimentat în ceea ce privește CMF (fig. 4B) indică o umflătură la porul de germinare la unele grăunțe, dar tuburile de polen nu sunt scoase în afară;

- fig.5, profilul HPLC al extractelor metanolice ale stigmatului speciei sălbatice V26 (fig. 5A) și a stigmatului CMF (fig. 5B). Absorbția la 360 nm a 100 μ l alicotă de extract preparat din 150 de stigme și fracționat într-un gradient metanol - apă pe o coloană cu fază inversă C₁₈. Detaliul din fig. 5A este un spectru vizibil în ultraviolet a unui vârf la 33,17 min și este identic cu cel produs de un standard autentic de kampferol. Un profil HPLC și un spectru vizibil în ultraviolet al unui extract de stigmat V26 hidrolizat cu un acid, arată că vârfurile majore la timpi de retenție 7,43, 10,10, 13,46 și 16,65 sunt glicozide de kampferol și quercetin.

- fig.6, graficul frecvenței de germinare a polenului ca o funcție a creșterii concentrației de flavonol aglicon, la care s-a adăugat Kampferol (cercurile goale), morin (cercurile pline), miricetin (triunghiurile goale), și 3-hidroxi flavone (triunghiurile pline) la mediul de germinare (GM) la concentrațiile finale indicate, iar germinarea a fost marcată după 4 ore de la incubatie. Frecvența de germinare medie a fost măsurată în trei experimente separate și este reprezentată grafic cu o eroare standard a mijlocului (SEM). Valorile SEM mai mici decât 1,4 nu sunt vizibile. Frecvența de germinare a polenului la specia sălbatică de control V26 este în general 75%, iar polenul CMF tratat cu DMSO nesalvat conduce la o polenizare cuprinsă între 1 - 2%.

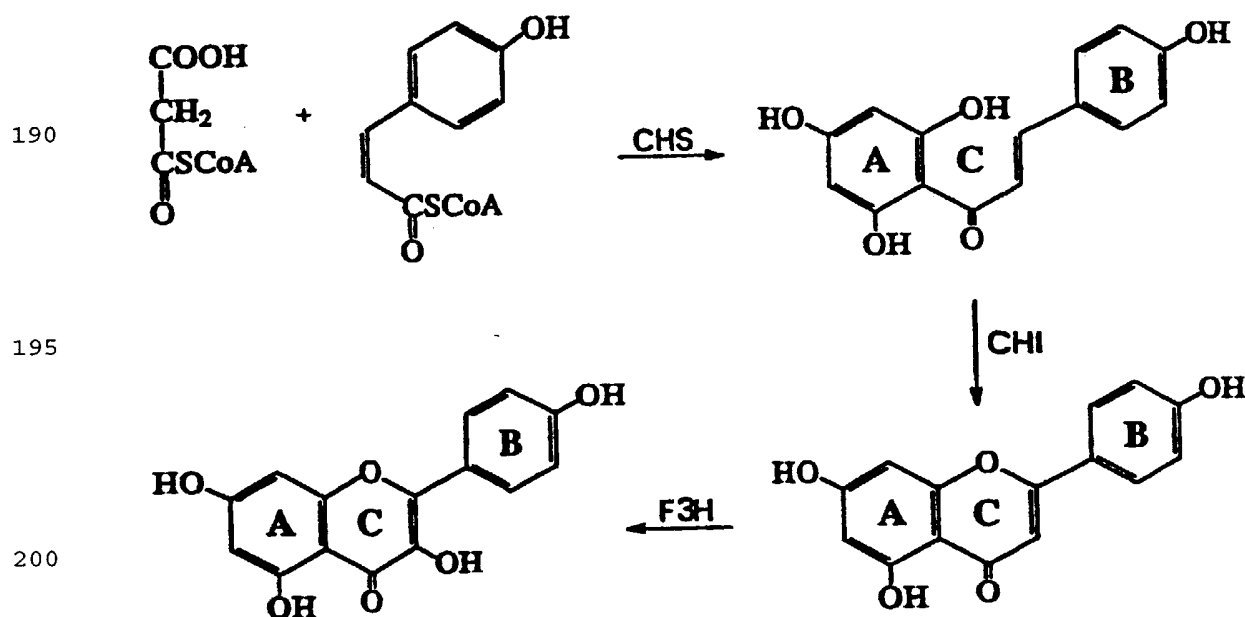
În conformitate cu un aspect al prezentei invenții, fertilitatea plantelor, la o plantă fertilă condiționat de parte bărbătească (CMF) deficientă în flavonoid, este restaurată prin asigurarea condițiilor în care polenul plantelor poate fi contactat cu flavonoli de restaurare a fertilității. Într-o realizare ilustrativă, condiții adecvate pot fi obținute prin contactarea polenului plantei cu o cantitate de flavonal de restaurare a fertilității, eficientă pentru a accelera germinarea și creșterea tubului polenului plantei. Așa cum este utilizat aici, termenul "deficient în flavonoid" la o plantă fertilă condiționat de parte bărbătească sau CMF, se intenționează a include plante în care activitatea chalcon sintazei (CHS) sau flavanon - 3 - hidroxilazei (F3H) a fost deteriorată, fie pe cale naturală, fie pe cale transgenică, pentru a distruge producția naturală de flavonoide în plantă. În mod corespunzător, plantele fertile condiționat de parte bărbătească flavonoid - deficiente, sunt, în general, deficiente în ceea ce privește pigmentul, rezultând o colorație în alb sau pală, și sunt în general auto-sterile.

Deși, invenția va fi descrisă aici în continuare în detaliu cu privire la petunii și porumb condiționat de parte bărbătească (CMF), totuși, și alte plante condiționat de parte bărbătească pot fi utilizate în mod similar în practica prezentei invenții.

În conformitate cu un alt aspect al prezentei invenții, fertilitatea plantelor poate fi reglată prin blocarea activității flavon-3-hidroxilazei (F3H) cu scopul de a produce plante cu fertilitate condiționat de parte bărbătească (CMF) care sunt în mod normal auto-sterile, dar a căror activitate poate fi salvată sau restaurată prin contactarea polenului plantei cu flavonol de restaurare a fertilității.

În biosinteza pe cale naturală a flavonolului, chalcon sintaza (CHS) condensează cu trei molecule de malonil - CoA - și o moleculă de p-cumaroil pentru a forma chalcononaringenin, care este convertit în mod spontan la naringenin (cu o viteză mică) și prin acțiunea chalconflavonizomerazei (CHI).

În faza următoare a acestei căi de biosinteză, flavanon-3-hidroxilaza catalizează adăuția unei grupări hidroxil la poziția C3 a inelului pentru a produce flavonol, care este necesar activității de restaurare a fertilității plantelor în conformitate cu prezenta invenție. Schema generală de biosinteză a flavonolului poate fi reprezentată după cum urmează:



Flavon-3-hidroxilaza este enzima de limitare a vitezei în producerea flavonolului, și a fost anterior clonată din *Artirrhurum majus* (Martin, J., Prescott, A. Mackay, S., Bartlett, J. și Vrijlandt, E., 1991, "Controlul biosintezei la florile de *Artirrhurum majus*, "The Plant J. 1: 37 - 39). Întrucât compușii flavonol aglicon sunt ceruți pentru fertilitate pe linie bărbătească, așa cum este descris aici, orice mijloc care blochează în mod eficient activitatea de hidroxilare a flavanon - 3 - hidroxilazei poate fi utilizat în scopul invenției. Astfel, de exemplu, substratele flavanon - 3 - hidroxilazei pot fi îndepărtate prin blocarea producției precursorilor în procesul de biosinteză, sau expresia F3H, CHI sau CHS poate fi blocată prin interferare cu expresia genei.

Într-o altă realizare ilustrativă, plante având blocată producția de flavonol pot fi produse prin formularea unui RNA antisens în plante care hibridizează la codificarea mRNA sau care sunt necesare pentru expresia flavanon - 3 - hidroxilazei sau unei enzime precursorare, cum ar fi chalconflavanonizomeraza, la plante. De exemplu, un promotor specific celulei tapetale poate fi fuzionat la gena flavanon - 3 - hidroxilazei într-o orientare antisens, iar construcția fuzionată poate fi introdusă în celulele plantei, cum ar fi, tutunul, petunia, roșia sau alte celule de plante folosind tehnici cunoscute, cum ar fi, transformarea mediată de *Agrobacterium*, bombardament cu particule, tehnici de introducere directă a DNA și altele asemănătoare (vezi, de exemplu, Napoli C., Lemieux C. și Jorgansen R., 1990, "Introducerea unei gene chimerice chalconsintază în petunia conduce la o co-reprimare reversibilă a genelor homoloage *in trans*, "Plant Cell 2:279; Mariani, C., De Baucklear, M. Truettner, J., Leenans, J. și Goldberg, R. B., 1990, "Inducerea sterilității de parte bărbătească în plante prin gene chimerice ribonucleaze", Nature 347: 737 - 741; și Celler, P.W., Min - Wong, L., Taylor, L.P., Pike, D.A., și Theologis, A., "Inhibirea reversibilă a senilității fructelor de tomate prin intermediul RNA antisens", Science 234: 437 - 439).

Promotorul tapetum poate fi izolat prin clonarea diferențială cDNA (Goldberg, R. B., 1986, "Plante: procese noi de dezvoltare", *Science* 240: 1460 - 1467) sau prin utilizarea unei probe de hibridizare generată de o reacție amplificată în lanț a polimerazei asupra secvențelor genomice (PCR) (vezi Saiki, R.K., 1990, "Amplificarea DNA genomice", în *PCR Protocols*, M.A. Innin, Felfand, D.H.Sninaky, J.J. și White, T.J. ed. Academic Press, San Diego, PP 13 - 20) omolog față de promotorii specifici - tapetum, publicații anterior. În mod alternativ, gena flavanon - 3 - hidroxilază poate fi izolată prin generarea unei probe de hibridizare folosind amorse oligonucleotide PCR (vezi Saiki, R.K., 1990, spura) bazate pe secvențe F3H de *Artirrhimumi* publicate.

Ca o alternativă ulterioară, genele codificate F3H, CHI sau CHS la o plantă pot fi modificate, mutate, îndepărtate, blocate sau în alt fel deteriorate pentru a preveni expresia enzimei F3H în plantă. De exemplu, gena codificată F3H din plantă poate fi eliminată din genomul nuclear al plantei și înlocuită cu gena F3H legată în mod operațional la un promotor ce poate fi indus, așa cum este descris în brevetul **EP 0465024** publicat la 8 ianuarie 1992, pentru a permite deblocarea controlată a producției de flavonol și a salva fertilitatea plantei prin expresia genei indusă din exterior. Suplimentar, pentru a bloca sinteza F3H *in vivo*, este de asemenea evident că activitatea F3H poate fi blocată cu miezuri care interacționează direct cu F3H pentru a inactiva sau deteriora activitatea hidroxilazei sale. Suplimentar, producerea flavonolilor poate fi deteriorată prin blocarea activității CHI; totuși, această alternativă este mai puțin preferată, întrucât conversia chalcononaringeninei la naringenină se produce spontan cu o viteză mică în absența chalconflavanonizomerazei.

Deteriorarea funcției bărbătești în plante în care lipsesc flavonoli ca rezultat al deficienței în activitatea CHS, CHI sau F3H conduce la anormalități nu prea mari în dezvoltarea polenului până imediat înainte de dehiscență, când morfologia anterei deviază de la normal în ceea ce privește culoarea, forma și dimensiunile. La dehiscență polenul rămâne grupat cu antera și, atunci când este văzută la microscop o proporție însemnată din grăunțe în locul apar mai încrețite decât normal. Deși polenul viabil este produs și răspândit, germinarea polenului și creșterea tubului este deteriorată, atât *in vivo* cât și *in vitro*. Suplimentar față de sterilitatea funcțională de parte bărbătească, plantele deficiente în flavonol prezintă unele aspecte de anto-incompatibilitate, așa cum este evidențiat de faptul că, polenul poate fi parțial salvat de stigmatele plantelor de specie sălbatică, dar nu de către stigmatele plantelor deficiente în flavonol. Deși elemente ale sterilității de parte bărbătească, cât și a auto-incompatibilității sunt eviente, stările prezentate de către polenul de la plante deficiente în flavonol constituie în mod clar o stare unică la care se fac referiri aici ca fiind fertilitate condiționat de parte bărbătească (CHF).

Plantele cu lipsă de CHS (și, ca urmare fără flavonoide) apar normale exceptând două lucruri: (1) lipsa de pigmentare flavonoidă și (2) producția de polen deteriorat care este în întregime dependentă de pistilele sălbatice (stigmat + stil) în scopul funcționării.

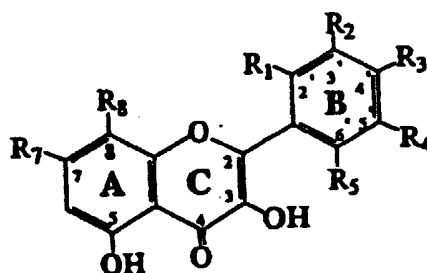
În timp ce plantele deficiente în CHS împart lipsa de pigmentare flavonoidă cu deteriorarea funcției polenului, unele diferențe dintre speciile de plante sunt evidente. Polenul alb de porumb germinează pe mătase și produce un tub de polen a cărui creștere se oprește la stil. În mod suplimentar, polenul mutant de porumb germinează *in vitro* și produce un tub aproape la fel de lung ca polenul de specie sălbatică (L.P.Taylor, observații nepublicate).

275 În contrast, polenul de la petunia deficientă în flavonoid nu penetrează stigmatul și nu
 produce un tub, atât *in vivo* cât și *in vitro*. Această diferență între porumb și petunia
 poate fi aplicată prin diferențele fiziologice dintre polenul tricelular (la porumb) și cel
 bicelular (la petunia). Polenul bicelular are o viteză respiratorie scăzută când este
 280 răspândit, formează o a doua celulă spermatică după răspândire, poate exista pe
 stigmat mai multe ore înainte de germinare și are o viteză inițială scăzută de creștere
 a tubului de polen. Polenul tricelular, prin comparație, se supune unei a doua distribuiri
 mitotice înainte de anthesis, are o viteză respiratorie ridicată când este împrăștiat,
 germinează în decurs de minute după contactul cu suprafața stigmatică și are o viteză
 285 mare de creștere a tubului. Întrucât polenul tricelular este făcut să crească repede
 după împrăștiere, tubul polenului alb de porumb crește până la o lungime semnificativă
 înainte ca vreun mecanism care oprește creșterea tubului să devină eficient.

La plantele florale cu generații alternante, sporofitul diploid produce spori
 haploizi care cresc și se divid pe cale mitotică pentru a produce gametofite. O parte
 din ciclul de viață gametofitic are loc în timp ce dezvoltarea sporilor polenului este în
 290 contact intim cu țesutul sporofitic înconjurător. Acest aranjament are posibilitatea
 interacțiunilor diploid-haploid. În plante heterozigote această interacțiune include, de
 asemenea, o comunicare haploid-haploid între cele două tipuri de gametofite, așa cum
 este reprezentat în fig. 1. Faptul că sterilitatea de parte bărbătească a petuniei defi-
 ciente în flavonoid, descrisă aici, este dominantă din punct de vedere genetic, în timp
 295 ce sterilitatea de parte bărbătească a polenului alb de porumb este regresivă din
 punct de vedere genetic, conduce la o concluzie interesantă în legătură cu întrebarea
 dacă gametofitele sau sporofitele sunt responsabile pentru acest efect. La porumb,
 androsterilitatea este exprimată numai în plante homozigote regresive, atât în ceea
 ce privește genele CHS, cât și C2 și Whp. Heterozigotele cu un singur exemplar, fie
 300 de C2, fie de Whp produc 100% grăunțe de polen fertil de culoare galbenă (Coe și
 alții, 1981). Astfel, în heterozigote fie sporofitele CHS - pozitive, fie 50% gametofite
 CHS - pozitive influențează expresia fertilității în gametofitele CHS - negative. În petunia
 transgenică, sterilitatea de parte bărbătească este asociată cu o particularitate domi-
 nantă și polenul produs de către plantele heterozigote este 100% steril privind partea
 305 bărbătească. În acest caz, sterilitatea este provocată fie de inhibarea gametofitelor
 CHS-pozitive de către gametofitele CHS reprimare, fie de către deficiența în CHS în
 sporofitele transgenice (fig. 1). Baza fiziologică privind deficiențele în CHS care deter-
 mină sterilitate de parte bărbătească, pare să fie aceeași la porumb și petunia, și la
 amândouă speciile sporofitele sunt cele care determină fenotipul steril, mai degrabă
 310 decât gametofitele. Astfel, fertilitatea condiționat de parte bărbătească, asociată cu
 deficiențe în CHS la porumb și petunia au o bază fiziologică comună.

Producerea de polen condiționat steril din plante deficiente în flavonol poate fi
 utilizată ca bază a încercării de salvare a polenului *in vitro*. Prin incubarea polenului
 transgenic în soluție de germinare suplimentată cu flavonoide purificate sau extracte
 315 de plantă și testând o frecvență de germinare și o creștere a tubului de polen accele-
 rată, pot fi identificați compuși specifici ceruți de funcția polenului. În acest mod, s-a
 determinat faptul că, o familie largă de compuși, flavonoizi, în general, nu este efi-
 cientă în mod uniform în restaurarea fertilității în plantele CMF, ci este preferabil un
 grup specific de flavonol aglicon pentru restaurarea fertilității, prevăzut în acest scop.

Orice flavonol care este eficient în inițierea germinării polenului unei plante CMF poate fi utilizat în practica prezentei invenții. S-a găsit totuși că majoritatea membrilor familiei relativ mari de flavonoide este ineficientă pentru acest scop. În mod corespunzător, este un aspect cheie al prezentei invenții că flavonolii eficienți în mod deosebit pentru restaurarea fertilității pot fi identificați și utilizați la restaurarea fertilității plantelor în condiții CMF auto - sterile. Într-o realizare preferată a invenției, flavonolul de restaurare a fertilității este un compus având o formulă corespunzătoare structurii generale:



unde: R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_7 și R_8 sunt hidrogen, hidroxil sau alcoxi având de la 1 până la 3 atomi de carbon. Mai preferabil, nu mai mult decât doi dintre R_1 - R_5 sunt hidroxil sau metoxi, iar R_1 - R_5 rămași sunt hidrogen, iar R_7 și R_8 sunt hidrogen, hidroxil sau metoxi. În prezent, compușii flavonoli preferați, în mod special, și reprezentativi în ceea ce privește restaurarea fertilității din prezenta invenție includ galangin, kampferol, izo-rhamnetin, quercetin și morin care au structura chimică generală arătată mai sus, având următorii substituenți:

Tabelul 1

Flavonol	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8
Galangin	H	H	H	H	H	-	OH	H
Kampferol	H	H	OH	H	H	-	OH	H
Izo-rhamnetin	H	OCH ₃	OH	H	H	-	OH	H
Quercetin	H	OH	OH	H	H	-	OH	H
Morin	OH	H	OH	H	H	-	OH	H

Alți flavonoli utilizabili în practica acestei invenții pot fi ușor determinați folosind metode de testare *in vitro* a salvării polenului prezentate în continuare.

Se prezintă, în continuare, 9 exemple în legătură cu invenția, acestea nefiind însă limitative.

Exemplul 1. Fertilitatea petuniilor deficiente în chalconsinază

Petunia transgenică și cea rezultată din încrucișări selective V 26 a fost menținută o foto-perioadă de 16/8 h într-o seră suplimentată cu lumină de halogenuri metalice la o intensitate de 300 - 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. V26 rezultat din încrucișări selective este o specie pigmentată de *Petunia hibridis*, care poate produce flavonoide în majoritatea țesuturilor plantei inclusiv polenul, anterele și filamentele, și pistilul (stigmat + stil) și este în întregime auto-compatibilă. Materialul transgenic analizat constă în doi regeneranți transformați independent, 218.38 și 218.41 (Napoli C.,

Mamieux C. și Jorgansen R., 1990) "Introducerea unei gene chimerice chalconsintază în petunia conduce la o co-reprimare reversibilă a genelor omoloage *in trans*", Plant Cell 2: 279 - 289) și indivizi din a doua generație încrucișată (BC2) a speciei parentale V26 (numărul populației 2425 până la 2435). Inserția T - DNA în acești transformanți conține secvențe CHS cDNA fuzionate la un promotor viral legat la o genă neomicin fosfotransferază II ca un marcator selectabil (apoli și alții, 1990). Încrucișările au fost efectuate prin eliminarea florilor cu 24 h, înainte de aplicarea polenului. Toate florile transgenice utilizate pentru încrucișare nu au arătat semne vizibile de pigment. Donorii de polen au fost selectați din plante care au avut 2 sau 3 antere dehiscențe sau disectate din antere împlinite, pre-dehiscențe așa cum s-a notat.

Plantele de petunia transgenice 218.41 și 218.38 au produs flori de culoare alb pur după introducerea unui exemplar adițional de genă CHS. Când expresia CHS a fost examinată în petale transgenice, a fost detectată de 50 de ori inducția în mRNA în comparație cu părintele netransformat sau descendenții somatici, atât în genele endogene, cât și în genele în care s-a introdus chalconsintază. Specia V26 rezultată din încrucișări selective produce pigmenți antocianinici de culoare purpurie în frunze, tulpină, peduncul, stil și filamentele anterei, precum și chalconă de culoare galbenă la anterele în dezvoltare. Comparativ, plantele transformate nu au pigmenți de flavonoide discernabili în oricare dintre aceste țesuturi. Lipsa unui pigment vizibil a fost confirmată de analiza HPLC a extractelor metanolice, așa cum este descris în exemplul 6. În mod normal, imediat înainte de împrăștiere, anterele de petunia umplute cu polen matur suferă o deshidratare. La dehiscență, când teaca anterei se rupe longitudinal în lungul stomium-ului, starea deshidratată a țesutului face ca cele două margini ale lobului anterei să se încrețească unul în celălalt pentru a expune grăunțele de polen. O inspecție amănunțită a plantelor transgenice nepigmentate a arătat că în decurs de 48 h înainte de dehiscență, anterele se scurtează în medie cu 40% din lungime și își schimbă culoarea de la crem-alb la cafeniu. Comparativ, anterele speciei parentale V26 netransformate se scurtează cu numai 15% și nu suferă o schimbare a culorii, rămânând galbene în timpul acestei perioade. O variație mare în ceea ce privește frecvența anterei dehiscențe s-a produs cu o frecvență mai mare în domeniul de la 0 până la 100%, asociată cu o umiditate relativă mai scăzută. Deși dehiscența poate fi ușor întârziată în raport cu planta parentală V26, anterele deficiente în flavonoid se deschid pentru a expune cantități normale de polen, care nu apare atât de ușor și friabil ca polenul V26 și rămâne îngrămadit în teaca anterei.

Nu rezultă semințe din numeroasele încercări de auto polenizare a plantei 218.41 deficientă în flavonoide folosind fie: (i) polen de la antere dehiscențe, scurtate, de culoare cafenie sau (ii) polenul disecat din antere albe, împlinite, pre-dehiscențe (vezi tabelul 2, coloana 5, "Auto încrucișare transgenică: 0 semințe pe teacă"). Auto încrucișările speciei parentale V26 au produs în medie 225 semințe per păstaie. Aceasta se traduce în aproximativ 17000 semințe posibile în 75 petunii transgenice auto încrucișate ce s-ar putea atinge. Toate plantele listate în tabelul 2 au fost testate privind fertilitatea pe linie femeiască prin polenizarea stigmatelor cu polen de la specia V26 rezultată din încrucișări selective. În toate cazurile păstăile au fost produse cu un set normal de semințe, indicând că plantele deficiente în CHS au fost fertile pe parte femeiască. Polenul transgenic, deficient în flavonoide, încrucișat reciproc pe stigmatele V26 a condus la producerea de cantități diferite de semințe, așa cum este arătat în tabelul 2.

*Producerea de semințe din polenul transgenic încrucișat
Număr de polenizări*

Polen transgenic V26 X		Transgenic auto încrucișat		
Polen parental ^a	0 semințe/teacă	1-150 semințe/teacă	150 semințe/teacă	0 semințe/teacă
02425.1 *	0	2	0	8
02430.5	0	5	3	6
02430.6	2	1	0	6
02430.8	ND	ND	ND	6
02432.2	ND	ND	ND	6
02435.1	0	1	1	6
02435.2	1	4	1	8
02435.3	0	1	1	7
j2425.1 *	0	1	0	1
j2428.1	ND	ND	ND	6
j2431.2	2	3	0	6
j2432.3 *	3	0	0	7
j2430.5 *	3	2	0	2

*Florile sau alte ramuri ale acestei plante au prezentat în cantitate mică pigment de culoare purpurie în corolă.

^aCel puțin 4 flori din fiecare plantă au fost polenizate cu polen V26 și toate au prezentat teci pline de semințe.

Numărul mediu de semințe per teacă a fost egal cu 225.

Din 37 plante încrucișate, dintre care 10 transgenice diferite ca părinți de parte bărbătească, 11 nu au produs teci, 20 au produs teci cu mai puțin decât 150 de semințe per teacă, iar 6 au produs mai mult decât 150 de semințe per teacă. Aceasta face în medie 60 de semințe per teacă sau o reducere de 70% față de setul de semințe. Aceste rezultate arată că în timp ce polenul de la plante deficiente în flavonoide este non-funcțional pe stigmatul acestora, el este parțial funcțional pe stigmatul de specie sălbatică, stare pe care am denumit-o aici ca fertilitate condiționat de parte bărbătească (CMF). Variația mare în ceea ce privește numărul de semințe per polenizare în aceste încrucișări este posibilă ca urmare a factorilor de mediu și/sau de dezvoltare.

Este puțin probabil ca CHF să se datorească inserției de T-DNA într-o genă cerută de fertilitate de parte bărbătească, întrucât doi transformanți independenți, 218.38 și 218.41 dispun de aceleași mijloace: o lipsă totală de pigmentare flavonoidă și fenotipuri sterile dominante de parte bărbătească identice. Un plus de evidență privind această concluzie vine de la observațiile lui Napoli și alții (1990) care afirmă

că regeneranții transformați revin câteodată, din punct de vedere somatic la plante complet pigmentate, dar rețin transgena, indicând că, doar prezența transgenei nu suprimă expresia endogenă CHS. Observații ulterioare și încrucișări ale acestor reveniri somatice arată că ele sunt pe deplin fertile pe parte bărbătească. Dată fiind
 455 asemănarea cu polenul alb din porumb, fertilitatea condiționat de parte bărbătească (CHF) în petunia pare a fi cauzată de o deficiență în flavonoide, cum este cea cauzată de suprimarea expresiei genei chalconsinază sau flavon-3-hidroxilază.

Exemplul 2. Germinarea polenului și creșterea tubului

A fost efectuată o germinare *in vitro* pe polen proaspăt colectat, în mediu simplificat Brewbaker, (Mulcahy G.B. și Mulcahy D.L., 1988, "Efectul mediului suplimentat asupra creșterii *in vitro* a polenului bi- și trinucleat", *Plant science* 35: 213 - 216), denumit câteodată, în continuare, "mediu de germinare" sau (GM). Polenul de la o singură anteră a fost plasat într-un vas microtitru cu 50 μ l de mediu, scuturat la temperatura camerei, timp de 6 până la 8 h și fotografiat cu film Kodac tehnic.

465 Creșterea tubului de polen *in vivo* a fost măsurată la 48 h de post-polenizare, așa cum este descris de către Herrero M. și Dickinson H.G., 1979, "Incompatibilitatea polenului -pistil în *Petunia hybrids*: modificări în pistil ca urmare a încrucișărilor intraspecifiche compatibile și necompatibile ", *J.Cell Sci* 36: 1 - 18. Dopurile îngroșate au fost vizualizate prin epifluorescență generată prin excitație la
 470 355 - 425 nm (cub D) și reprimarea lungimii de undă de 460 nm de la un Aristoplan Leitz. Specimenele au fost fotografiate cu film Ektachrome T 160, iar tipărirea s-a făcut de la un internegativ.

Viabilitatea polenului a fost determinată prin tehnică fluorocromatică (FCR) (Heslop-Harrison J. și Heslop-Harrison Y., 1970, "Evaluarea viabilității polenului prin fluorescență indusă pe cale enzimatică; hidroliza intracelulară a diacetatului de fluoresceină" *Stain Technol.* 45: 115 - 120) prin încălzirea polenului proaspăt dehiscent într-o soluție de acetat de carboxifluoresceină (1mM) în mediu de germinare. Epifluorescența a fost vizualizată așa cum s-a descris mai sus.

Producerea calozității

480 Tuburile polenului de petunia penetrează în mod normal stigmatul aproximativ o oră după germinare (Herrero și Dickinson, 1980) și cresc în jos prin țesutul stilului pentru a depozita cele două celule spermatice în sacul embrional. Calozitatea este o structură polimerică de polizaharide legate prin legături beta(1-3) glicozidice și dopurile din acest material sunt în mod normal depuse la intervale regulate în josul tubului de creștere a polenului. Calozitatea este vizualizată prin fluorescența sa distinctivă după
 485 însemnare cu anilină albastră decolorată (Curier 1957; Eschrich și Currier, 1964). Germinarea și creșterea tubului de polen în plantele deficiente în CHS auto încrucișate, din exemplul 1, precum și în încrucișările inverse ale acelorași plante au fost examinate cu polen V26. Pistilele au fost recoltate, la 48 h după polenizare, însemnate cu
 490 anilină albastră decolorată și examinate pe microscop fluorescent. A fost observat un model regulat de depozite de calozități pe întreg traseul în josul stilului în pasta pistilelor deficiente în flavonoide polenizate de către V26. Pe de altă parte, nici o calozitate nu a fost observată în pistilele petuniei auto polenizate, cu toate că au fost prezente cantități abundente de polen pe stigmă.

Morfologia și germinarea polenului

495

A fost efectuată o examinare microscopică a polenului proaspăt răspândit din plantele cu deficiență în flavonoide, din exemplul 1, și nu au ieșit în evidență anomalități mari. Polenul de petunia germinază ușor și produce un tub când este incubat în mediu lichid simplu. Polenul germinat din fiecare dintre familiile BC2 (2425 până la 2435) a fost comparat cu polenul V26 *in vitro*. O reprezentare tipică este arătată în fig. 2. După cum se observă, după 6 h de creștere, multe din grăunțele de polen mutante au realizat germinarea, așa cum s-a putut constata ca urmare a mirosului pronunțat în jurul unuia dintre porii de germinare (săgețile, fig. 2), dar cel mult 2% din grăunțele de polen din plante deficiente în flavonoide au produs un tub de o anumită lungime. La grăunțele de polen care au produs tuburi de lungimi măsurabile, lungimea a fost mai mică decât 20% față de lungimea tuburilor de polen V26 crescute în condiții identice.

500

505

Pentru a determina dacă polenul produs și răspândit de plantele deficiente în flavonoide a fost viabil și, ca urmare capabil de germinare și de creștere a tubului de polen, a fost efectuată o analiză fluorocromatică (FCR) privind viabilitatea polenului transgenic proaspăt împrăștiat și polenul V26. Acest test depinde de preluarea compusului diacetat de fluoresceină în grăunțele de polen cu conversia ulterioară la fluoresceină cu ajutorul enzimelor intracelulare. Fluoresceina este puternic polară și rămâne sechestrată, mai probabil în citoplasma celulei vegetative, unde ea este vizualizată la un microscop fluorescent. Polenul V26 rezultat din încrucișări selective constă dintr-o proporție ridicată (până la 40%) de grăunțe FCR negative, anormal de mici cărora le lipsește în întregime vreun mijloc intern. Numeroase grăunțe de acest tip pot fi văzute în fig. 2A, inclusiv două în centrul fotografiei. Această populație nu germinază niciodată și cel mai probabil avortează grăunțele. Dintre grăunțele rămase (60%), aproape toate au prezentat un test pozitiv FCR, indicând prezența membranelor de plasmă intacte și a esterazei citoplasmice active. Polenul de la anterele mutante a reținut într-o proporție ridicată grăunțele încrețite avortate. Dintre grăunțele aparent normale rămase, mai mult decât 90% erau FCR pozitive. Faptul că majoritatea polenului produs de către plante deficiente în flavonoide a fost viabil și activ din punct de vedere metabolic arată că este necesar un anumit aspect al activității CHS pentru o germinare normală a polenului și pentru creșterea tubului de polen.

510

515

520

525

Exemplul 3. Observații microscopice ale dezvoltării anterei

Pentru a determina dacă lipsa activității CHS în timpul microsporogenezei modifică arhitectura celulară a grăunțelor de polen în dezvoltare sau a țesutului anterei, a fost comparată dezvoltarea polenului în V26 și în plante deficitare în CHS O2425.1. Au fost recoltate antere de la bobocii unei specii de petunia în faza de dezvoltare, variind ca lungime, între 0,1 până la 6 cm, fixate în paraformaldehidă, 1,25% glutaraldehidă în tuburi, pH= 7,2, sădite în rășină Spurr, iar secțiuni de 1 μ M au fost însemnate cu albastru de toluidină. Au fost făcute microfotografii cu film tehnic Kodak. Din punct de vedere histologic aceasta reprezintă toate stările de microsporogeneză, de la prima evidență a diferențierii țesutului archesporial până la antere predehiscente umplute cu polen matur. O atenție mare a fost dată dezvoltării și dezintegrării ulterioare a tapetum-ului, întrucât acest țesut se crede că ar fi sursa flavonoidelor polenului. În toate stadiile, antera transgenică și microsporii în dezvoltare nu au arătat diferențe mari din punct de vedere histologic, dacă se compară cu V26.

530

535

540

Secțiuni suplimentare au fost luate de la antere deficiente în flavonoide, în timpul tranziției de la cel alb, împlinit până la cel încrețit, de culoare cafenie și comparat cu stadiile similare ale V26 (fig. 3). Precedând dehiscența, celulele stratului endotelial expandează radial în mod normal, se îngroașă și depun un material care se crede că ar fi implicat în mecanismul ruperii anterei (Cutter, E.G., 1978, "Anatomia plantelor: Experimentare și interpretare. Partea 1, "Cells and Tissues, ed 2-a, Londra: Arnold). Acest strat nu este continuu, fiind absent în zona care înconjoară stomium. Secțiunile anterei încrețite de culoare cafenie nu au arătat anormalități mari la stratul endotelial, stomium, sau cuticul care înconjoară antera. Totuși, când se compară cu polenul V26 (fig. 3, Coloana "V26") o proporție mai mare de grăunțe încrețite lipsite de mijloace interne au fost prezente în loculi plantelor transgenice, iar grăunțele mai mari au apărut mai heterogene ca dimensiuni, formă și reacție la însemnare (fig. 3C și 3D). Heterogenitatea arătată în fig. 3C și 3D poate fi explicată prin faptul că polenul este în mod normal răspândit într-o stare de deshidratare avansată și suferă o rehidratare rapidă pe stigmat. Polenul deficient în flavonoide este într-o stare mult mai deshidratată, decât normal, și când este plasat într-un mediu de germinare lichid pare a se rehidrata până la aspectul normal.

Exemplul 4. Extracte flavonoide de petunia

Analize ale extractului de polen de la petunia au identificat flavonoidele importante cum sunt 3-o-glicozidele quercetinei și kamferolului, 4,2',4',6'- tetrahidroxichalconă, și dihidroflavonol, taxifolin (Zerback, R., Bokel, M., Geiger, H. și Hess, L., 1989, *Phytochemistry* 28:897-899; Zerback, R., Dressler, K. și Hess, D., 1989, *Plant Science* 62: 83 - 91; De Vlaming, P. și Koh, K.F.F., 1976, *Phytochemistry* 15: 348 - 349). Polenul de porumb conține cel puțin 10 glicozide ale kamferolului, quercetinei și izo-rhamnetinului (Ceska, O. și Styles, E.D., *Phytochemistry* 23: 1822 - 1823). Extracte apoase din speciile de petunia V26 rezultată din încrucișări selective și cea sălbatică au fost produse prin macerarea stigmatului cu penseta sau agitând suspensia de polen în PEG 4000 mediu (W.Jahnen, W.M.Lush A.E. Clasrke, 1989, *Plant Cell* 1: 501), denumit aici ca GM, centrifugând, timp de 5 min într-o microcentrifugă și administrând alicotii de supernatant direct într-o suspensie de polen CMF în GM pe o placă de microtitru de 96. Extractele de metanol au fost produse urmărind același protocol de lucru, cu excepția faptului că extractul a fost uscat sub vacuum și resuspendat în GM înainte de adăugare la suspensia de polen. Experimentul de însănătoșire inițial a reușit să obțină o viteză de germinare de 33% folosind 20 de μ l (o cincime din volumul total) dintr-un extract apos preparat din zece stigmate V26. Pentru control, extractele au fost preparate similar din stigmate și polen ale unor plante fertile condiționat de parte bărbătească. În încercările de germinare a polenului numai extractele din stigmat și polen V26 au fost capabile să restaureze germinarea și creșterea tubului la polenul deficient în flavonoide. Tipul de polen sălbatic și cel fertil condiționat de parte bărbătească și extractele de stigmat au fost analizate, după cum urmează: stigmatele și polenul au fost extrase întâi cu metanol 50%, urmat de metanol 100%, iar extractele au fost reunite și concentrate. Agliconii au fost produși prin hidroliză acidă: extractul a fost amestecat vol/vol cu HCl 4N, trecut într-o ampulă de 2 ml și hidrolizat în apă la fierbere, timp de 40 min. Probele replică au fost injectate într-o coloană C₁₈ cu fază inversă (Phenomenex Spherisorb 5 CDS 2250 x 4,6 mm).

Solventul A a fost acid acetic 5%, iar solventul B a constat din 5% acid acetic în 80% acetonitril. Fiecare șarjă a constat dintr-un gradient isocratic de 6 min (20% B), urmat de un gradient linear de 20 min, cu 95% B și terminat în mod isocratic la 95% B, timp de 14 min. Debitul de solvent a fost de 0,5 ml/min, la temperatura camerei. Detectia s-a făcut la 360 nm, cu un aparat Hewlett Packard 1040 A cu un sistem detector cu fotodiodă. Kampferolul a fost detectat în extractul de stigmat de la specia sălbatică la 60 ng stimat, iar quercetinul la nivele substanțial mai scăzute. Extrase identice dintr-o sursă de stigmat fertile condiționat de parte bărbătească în număr de 150 sau din 500 antere fertile condiționat de parte bărbătească în număr de 150 sau din 500 antere fertile condiționat de parte bărbătească nu au prezentat vârfuri care să dea un spectru tipic de flavonoide.

590

595

Tratamentul extractului stigmatic de tip sălbatic cu proteine care digeră enzimile, căldură și trecerea prin membrane de dimensiuni moleculare a arătat că compusul activ a fost o moleculă mică non-proteică. Greutatea moleculară a produsului activ a fost estimată prin trecerea extractului printr-un filtru pentru greutatea moleculare până la 3000 dalton (Centricon -30 filter, Amicon) și s-a stabilit că polenul își restabilește activitatea trecând prin filtru. Extractele apoase de stigmat și polen au fost tratate cu 0,025 unități de pagină, timp, de 30 min, la temperatura, de 37°C într-un volum de reacție de 100 μ l. Extractele au fost de la specia V26. Activitatea enzimei a fost verificată prin tratarea BSA (0,5 mg/ml) în aceleași condiții și prin examinarea produselor de digestie prin electroforeza gelului de SDS-poliacrilamidă (PAGE). Nici tratamentul cu protează, nici căldura (100°C, 5 min) nu a eliminat capacitatea extractelor de a salva germinarea polenului și creșterea tubului de polen la plante fertile condiționat de parte bărbătească.

600

605

În mod colectiv, aceste rezultate arată că flavonoidele prezente în polenul de tip sălbatic joacă un rol în germinarea polenului și că stigmatul la tipul sălbatic conține compuși similari care pot compensa lipsa de flavonoide în polenul plantelor fertile condiționat de parte bărbătească.

610

Exemplul 5. Salvarea cu flavonol a fertilității CMF

Complementarea biochimică a polenului deficient în flavonoide din exemplul 1 a fost realizată prin adăugarea unei concentrații scăzute de kamferol (1 μ M), flavonol aglicon, la o suspensie de polen fertil condiționat de parte bărbătească în mediul de germinare (GM). Așa cum este arătat în fig. 4, o comparație parte cu parte, efectuată pe o durată de 12 h, ca perioadă de creștere, a confirmat că germinarea a fost inițiată simultan și că creșterea tubului are loc cu aceeași viteză și la aceeași extindere în polenul fertil condiționat de parte bărbătească salvat (K +) ca și la specia de polen sălbatic care nu a primit un supliment de flavonol (C). Salvarea a fost aproape completă; polenul suplimentat cu flavonoide a arătat o frecvență de germinare de 80% în raport cu polenul V26. Polenul fertil condiționat de parte bărbătească (CMF), la care s-a adăugat numai solvent DMSO (K -) nu a arătat o germinare semnificativă (1 - 2%), iar tuburile de polen, dacă ele au germinat, nu au progresat în lungime mai mult decât două diametre ale grăunțelor de polen.

615

620

625

Pentru a confirma că extractele de stigmat de tip sălbatic care sunt capabile de a salva germinarea polenului și creșterea tubului de polen conțin kampferol, extractul nehidrolizat a fost fracționat cu ajutorul HPLC și analizat cu ajutorul spectrografiei de absorbție în ultra-violet vizibil. Un pic cu un timp de retenție și un spectru tipic de

630

flavonol (absorbția maximă în jur de 260 și 360 nm) a fost detectat în extractul de stigmat V26 (fig. 5A și detaliu). Acest pic prezumtiv de kampferol a fost colectat, evaporat până la sec, resuspendat în DMSO și adăugat la mediul de germinare (MG) *in vitro* unde el a provocat o germinare completă și un răspuns al creșterii tubului de polen de la polenul fertil condiționat de parte bărbătească. Cromatografia-Re a acestei fracțiuni active cu un standard autentic de kampferol a confirmat puritatea și identitatea lui. Din această analiză a 150 de stigmate, cantitatea de kampferol în stigmatul V26 este calculată a fi de 60 ng per stigmat. Presupunând un volum al stigmatului de 34 μ l (volum de înlocuire), concentrația de flavonol în stigmatul de V26 este de aproximativ 6 μ M, nivel care este capabil de a provoca un răspuns de germinare puternic. O analiză identică a unui extract dintr-o sursă de stigmat fertil condiționat de parte bărbătească în număr de 150 sau din 500 de antere fertile condiționat de parte bărbătească nu s-au obținut picuri care să dea un spectru tipic de flavonoide (vezi fig. 5B). Extracte de polen V26 și antere au produs o cromatogramă similară celei arătate în fig. 5A, iar picul de eluent, cu un timp de retenție și cu spectru în ultra-violet vizibil indicând kampferolul, când s-a adăugat la CMF în mediul de germinare a dat un polen de germinare pe deplin stimulat. Această analiză confirmă că kampferolul este prezent în polenul și anterele speciei sălbatice.

Particularități structurale necesare activității de salvare a polenului

Extractele de polen și stigmat din specia sălbatică de petunia conțin alți compuși în plus față de kampferol, care pot, de asemenea, stimula germinarea polenului și creșterea tubului de polen (vezi fig. 5A). În consecință, au fost testați în legătură cu activitatea de salvare a polenului compușii reprezentativi din toate clasele importante de flavonoide: flavone, flavanone, flavonoli, izo-flavonoide, chalcone, antociani și catechine. Grăunțele de polen de petunia au fost suspendate în mediu de germinare (GM) PEG 4000 la o densitate de $1 - 2 \times 10^4$ /ml, iar 100 μ l de alicotii din suspensie au fost plasați în rețeaua unei plăci microtitru de 96 și au fost incubati, la temperatura camerei, cu agitare la 150 rot/min. Alte suplimente au fost adăugate direct la mediul de germinare înainte de adăugarea polenului. Soluții stoc de flavonoide și alte chimicale au fost preparate direct în dimetilsulfoxid (DMSO) și adăugate la fiecare cavitate, la concentrațiile finale indicate în tabelul 3, de mai jos. Concentrația dimetilsulfoxidului a fost menținută constantă la 1% în fiecare test. Polenul a fost considerat ca germinat, atunci când tubul era mai lung decât diametrul unui grăunțe de polen. Practic, toate grăunțele care au germinat au produs un tub mai lung decât 5 diametre ale grăunțelor de polen. Petunia V26, așa cum a fost descrisă în exemplul 1, produce două tipuri de polen matur; aproximativ 25% din grăunțe sunt mici, fără particularități interne și acestea nu germinează niciodată *in vitro*. Prin urmare, germinarea completă la V26 are loc atunci când 75% din totalul grăunțelor de polen au germinat. Polenul de petunia fertilă condiționat de parte bărbătească din exemplul 1 menține același raport. În experimentele cele mai salvatoare, frecvența de germinare maximă a fost de 89% din grăunțele viabile. După 4 h de incubare au fost înregistrate în fiecare test minimum 1000 de grăunțe de polen. Cea mai scăzută concentrație a compușilor testați necesară pentru a obține un răspuns de germinare este arătată mai departe în Tabelul 3, în care NR înseamnă fără răspuns. Compușii care au produs mai puțin de 20% germinare la 100 μ M sunt indicați ca > 100 μ M. Suplimentar față de compușii listați în tabelul 3, au fost testate și nu au produs nici un răspuns,

RO 116095 B1

substanțe non-flavonoide ca acid *p*-cumaric, acid salicilic, hidrochinonă, acid clorogenic, acid dihidroascorbic, acid naftilftalmic (NPA), acid 1-naftalenacetic (NAA), acid indol-3-acetic (IAA) și acid gibberelic (GA3).

680

Tabelul 3

Compusul	Substituenți la carbonul							Concentrație de răspuns [μ M]
	3	5	7	2'	3'	4'	5'	
Flavonoli (C_2-C_3)								
Galangin	OH	OH	OH					1
Kampferol	OH	OH	OH			OH		1
Izo-rhamnetin	OH	OH	OH		OCH ₃	OH		1
Quercetin	OH	OH	OH		OH	OH		10
Morin	OH	OH	OH	OH		OH		10
Myricetin	OH	OH	OH		OH	OH	OH	100
Fisetin	OH		OH		OH	OH		100
3-Hidroxiflavonă	OH							>100
Dihidroflavonol (C_2-C_3)								
Taxifolin	OH	OH	OH		OH	OH		>100
Flavone (C_2-C_3)								
Flavonă								NR
7-Hidroxiflavonă			OH					NR
Apigenin		OH	OH			OH		NR
Luteolin		OH	OH		OH	OH		NR
Flavanone (C_2-C_3)								
Flavanonă								NR
Naringenin		OH	OH			OH		NR
Eriodictyol		OH	OH		OH	OH		NR

685

690

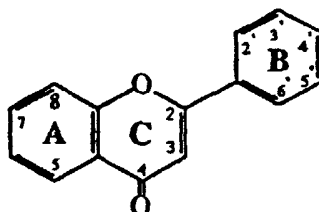
695

700

705

Așa cum s-a arătat în tabelul 3, pozițiile substituenților - R corespund flavonoidelor având formula:

710



715

Aşa cum se poate vedea din tabelul 3, aglicon flavonolii au restaurat cu succes frecvenţa maximă de germinare şi capacitatea de creştere a tubului de polen fertil condiţionat de parte bărbătească, dar dintre celelalte clase de flavonoide numai cele relativ apropiate ca dihidroflavonol, taxifolin au produs un răspuns modest (aproximativ 18%) la 100 μ M. Suplimentar, au fost testaţi compuşi din numeroase clase non-flavonoide, incluzând acizi fenolici, anti-oxidanţi şi regulatori de creştere a plantelor, dar nici unul nu a fost capabil să salveze germinarea polenului. De aici înainte, capacitatea de a salva funcţia polenului la concentraţii relevante din punct de vedere fiziologic a fost atribuită doar flavonolilor.

Din şirul de flavonoide testate, par a fi necesare cinci caracteristici structurale generale pentru germinarea maximă a polenului şi creşterea tubului. Sunt condiţii absolut necesare pentru o grupare hidroxil nesubstituită la al treilea atom de carbon şi o grupare ceto la poziţia 4 din inelul de atomi de carbon. Răspunsul maxim depinde de o legătură nesaturată între atomii de carbon 2 şi 3 din ciclu şi de gradul de substituţie a grupelor hidroxil la inelele A şi B. Cel mai interesant este că flavonolii glicozilaţi, prin poziţia 3 a hidroxilului sunt inactivi, deşi ei sunt pe departe cea mai abundentă formă de flavonoli care se găsesc în ţesutul plantelor, inclusiv în polenul şi stigmatul de petunia. Nu s-a obţinut nici o germinare a polenului când au fost testate quercetin-3-O-glucozida şi rutinul (quercetin-3-O-rhamnoglucozida), la concentraţii, de până, la 100 μ M.

Cerinţa pentru gruparea ceto la poziţia 4 a inelului de atomi de carbon este indicată de faptul că în cazul catechinei, care nu o are, lipseşte activitatea. O comparaţie a eficienţelor relative ale taxifolinului (aproximativ 18%, la 100 μ M) şi a quercetinei (aproximativ 50%, la 10 μ M) au arătat că o dublă legătură între atomii de carbon 2 şi 3 din inel conduce la creşterea răspunsului de aproximativ 30 de ori. O comparaţie a quercetinei cu fisetin sau cu 3-hidroxiavona, arată că fiecare grupare hidroxil, adiţională, fie la poziţia 5, fie la poziţia 7 a inelului A conduce la creşterea răspunsului, de aproximativ, 10 ori. Această creştere ar putea depinde în mare măsură de efectul stabilizator al interacţiunii dintre gruparea hidroxil de la poziţia 5 şi gruparea adiacentă ceto din inelul de atomi de carbon. În final, substituţiile de hidroxil din inelul B nu sunt necesare pentru o activitate totală, şi de fapt creşterea numărului de grupări produce în realitate o scădere a activităţii (a se compara kampferol cu quercetin şi muricetin). Această diferenţă ar putea fi datorată absorbţiei slabe sau creşterii legăturii nespecifice cauzată de natura mai polară a flavonolilor cu numeroase grupări hidroxil.

Unele flavonoide non-active au fost raportate ca împiedicând inducţia de flavonoid activă a genelor de nodulare din sistemul de legume - *Rhizobium* (Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M. şi Rolfe, B.G., 1987, *EMBO* 6: 1170 - 1179; Peters, N.K. şi Long, S.K., 1988, *Plant Physiology* 88: 396 - 400). Compuşii care nu au fost activi în ceea ce priveşte funcţia de salvare a polenului au fost testaţi în ceea ce priveşte abilitatea lor de a contracara acţiunea aglicon flavonolilor, după cum urmează. Polenul fertil condiţionat de parte bărbătească, aşa cum este descris în exemplul 1, a fost expus în mediul de germinare la compuşi inactivi la concentraţii, de 1 şi 10 μ M, timp de 30 min, înainte de adăugarea kampferolului la 1 μ M. Experimentul a fost astfel efectuat prin introducere simultană, atât a compusului inactiv, cât şi a kampferolului, la raporturi 1:1 sau 10:1, la suspensia de polen.

Frecvența de germinare a polenului a fost înregistrată după 4 h de la incubatie și nu a fost detectată nici o acțiune de contracarare în oricare dintre combinațiile testate. Au fost analizați următorii compuși inactivi: apigenină, chalconă, eriodictiol, flavonă, flavanonă, luteolin, naringenin, catechină, acid clorogenic, acid *p*-cumaric, hidrochinonă și acid salicilic.

765

Exemplul 6. Efecte în ultra-violet

În parte datorită capacității lor de absorbție a luminii ultra-violete, flavonoidele au fost postulate ca având funcție protectoare față de ultra-violete în plante (W.Jahnen și K.Halbroch, 1988, *Planta* 173:453).

770

Pentru a determina dacă lipsa de germinare în polenul deficient în flavonoide s-a datorat efectelor razelor ultra-violete, s-au efectuat experimente de germinare la întuneric, cu trei modificări. Polenul a fost recoltat, fie de la flori care au fost colectate și înmagazinate (în apă) la întuneric complet, timp de 24 de h, fie de la flori proaspăt culese. Suspensiile de polen din aceste două surse în mediul de germinare cu sau fără flavonoli au fost preparate în camere întunecoase folosind o lumină roșie de siguranță. Cea de-a treia modificare a inclus prepararea suspensiei de polen de la flori proaspăt recoltate la lumină, dar cu adăugarea soluției de flavonoli în întuneric. Toate speci-
nele au fost înfășurate în frunze și apoi incubate, așa cum este descris în exemplul 5. Nu a existat un efect detectabil al luminii asupra frecvenței de germinare, fie la polenul de control V26, fie la polenul deficient în flavonoide, cu sau fără adăugare de flavonoli.

775

780

Pentru a determina dacă lumina ultra-violetă afectează auto-fertilizările, plante de petunia matură au fost crescute mai multe săptămâni sub un filtru de 610 nm, așa cum este descris de către L.P. Taylor și W.R.Briggs, 1990, *Plant Cell* 2: 115. Pentru a se forma mugurii de petunia și a se maturiza, au fost necesare aproximativ 2 săptămâni. Numai acei muguri care s-au format după ce planta a fost plasată sub filtru, și astfel nu au fost expuse luminii sub 610 nm, au fost testate și auto fertilizate. Nici un set de semințe nu s-a produs în oricare dintre plantele fertile condiționat de parte bărbătească auto încrucișate (10 încercări), în schimb toate cele de control V26 auto încrucișate au realizat, în aceleași condiții, păstăi cu setul întreg de semințe.

785

790

Exemplul 7. Efectul timpului de expunere la flavonol

Proporția de expunere la flavonoide, necesară pentru o germinare completă și o creștere maximă a tubului de polen a fost determinată prin varierea timpului de germinare a polenului, timp în care polenul a fost în prezența flavonolului. O concentrație de kampferol calculată pentru a realiza o salvare aproape maximă, și îndepărtată ușor prin spălare (0,5 μ M final), a fost adăugată pe un vas Petri 60 x 15 mm conținând o suspensie de 5 ml de polen deficient în flavonoide în mediul de germinare (GM), iar suspensia rezultată a fost continuu rotită cu 150 rot/min. La timpii indicați în tabelul 4, s-au preluat alicotii de câte 400 μ l, s-au centrifugat, s-au spălat în 1 ml mediu de germinare pentru a îndepărta kampferolul, s-au recentrifugat, s-au resuspendat în 400 μ l mediu de germinare și au fost împărțiți în două porțiuni. Un alicot de 100 μ l a fost din nou suplimentat cu 0,5 μ M kampferol (de control), iar cealaltă porțiune a fost lăsată să-și continue creșterea fără o tratare cu flavonol adițional. Creșterea a fost lăsată să continue un timp de 4 h de la formularea suspensiei originale, apoi a fost înregistrată frecvența de germinare și creșterea tubului de polen în lungime, atât în germinarea tratată, cât și în cea de control. Rezultatele sunt indicate în tabelul 4, care urmează:

795

800

805

Tabelul 4

Polen tratat		De control	
Timp de expunere (minute)	Germinare (%)*	Lungimea tubului**	Germinare (%)*
0	3,7 +/- 1,5	2x	48,3 ± 2,5
10	6,6 +/- 2,7	2x	55,5 ± 8,6
20	15,7 +/- 9,2	2-3x	47,9 ± 7,0
30	13,8 +/- 1,7	2-3x	3,7 ± 1,5
60	38,9 +/- 2,9	3x	48,4 ± 1,3
120	47,3 +/- 3,6	mai mare de 5x	47,7 ± 2,2

* medie +/- SEM, n = 3

** în raport cu diametrul grăunțelor de polen.

Așa cum se poate vedea din tabelul 4, o creștere măsurabilă în ceea ce privește germinarea a fost detectată la un timp de expunere scurt de 10 min (tabelul 1). Pentru o frecvență de germinare maximă și o creștere maximă a tubului de polen a fost necesar un timp de expunere, cuprins între 1 și 2 h.

Exemplul 8. Salvarea fertilității *in vivo*

Ușurința de a restaura autofertilitatea la petunia fertilă condiționat de parte bărbătească prin furnizare de flavonol aglicon polenului în timpul polenizării a fost testată prin înregistrarea fertilizărilor reușite care rezultă din auto încrucișarea petuniei fertile condiționat de parte bărbătească realizată în prezența flavonolilor adăugați. Înainte de auto polenizare, flavonul agliconul a fost administrat, fie (i) direct la stigmat, fie (ii) în amestec cu polen proaspăt colectat. Tehnica cea mai reușită, măsurată prin cantitatea de sămânță introdusă, reclamă administrarea flavonolului la stigmat cu 12-16 h înainte de auto- polenizare. Au fost efectuate 47 de autoîncrucișări cu kampferol sau quercetin adăugat, și aproape 60% (27 din 47) au produs păstăi cu semințe. Numărul semințelor per păstaie a variat de la 31 până la 287, și în testele de germinare, mai mult, de 90% din semințe dintr-o singură păstaie erau viabile. Toate auto încrucișările efectuate fără adăugare de flavonol (mai multe decât 30 încercări) nu au condus la semințe.

Caracteristica dominantă a petuniei cu fertilitate condiționat de parte bărbătească manifestată de planta deficientă în flavonoid este strâns legată de o a doua genă dominantă ce conferă rezistență la kanamicină (KAN) (Napoli C., Lamieux C., și Jorgensen R., 1990, "Introducerea genei chimerice chalconsintază în petunia conduce la o coreprimare a genelor omoloage *in trans*", Plant Cell 2:279 - 289). Indicatorul KAN a fost utilizat pentru a testa segregarea caracterului fertilității condiționat de parte bărbătească (CMF) în semințele produse prin auto încrucișare a plantelor deficiente în flavonoide în prezența de flavonol adăugat. Semințe proaspăt recoltate au fost sterilizate la suprafață în 20% decolorant, spălate cu apă sterilă și umectate, timp, de 30 min, în 100 ppm soluție GA3 înainte de așezare pe plăcile de germinare (1 x MS, 3 mM MES/pH= 5,6/, 1 x amestec vitamină B5, sucroză 3% și agent de solidificare 0,2%), conținând 199 μg/ml kanamicină.

După creștere, la temperatura, de 23°C, suplimentată cu o fotoperioadă de 16/8 h, rezistența la kanamicină a fost apreciată prin sitare pentru prezența frunzelor adevărate și rădăcinilor laterale, nici una din ele nefiind produsă de răsaduri sensibile la kanamicină. În tabelul 5, care urmează, valorile P reprezintă nivelul observat al semnificației pentru un grad de libertate al testului ("chi-square goodness-of-fit").

855

Tabelul 5

Păstaie	Răsaduri			
	Total	KAN	KAN	P(3:1)
1	75	58	17	0,74
2	65	50	15	0,83
3	81	59	22	0,75

860

Așa cum este arătat în tabelul 5, semințele au germinat în prezența a 100 $\mu\text{g/ml}$ kanamicină izolată, într-un raport de 3:1 rezistență la KAN: sensibilitate, așa cum a fost de așteptat pentru o trăsătură dominant heterozigotă, așa cum este arătat în tabelul 5.

865

Exemplul 9. Încercare de câmp

O încercare de câmp a fost efectuată folosind un mutant de porumb deficient în flavonoide rezultat pe cale naturală, al cărui *polen alb*, deficient în ceea ce privește activitatea CHS, produce un polen alb, ne-funcțional și este auto steril (E.H. Coe, S.M. McCormick, S.A.Modena, 1981, J.Hered. 72:318). Plantele de porumb cu polen alb utilizate au avut mutații regresive stabile la *C2* și *Whp* transformate într-un fundal de W23 rezultat din încrucișări selective. Plantele cu polen alb (*c2/c2 whp/whp*) au fost menținute prin încrucișarea cu polen din plante isogenice purtând un singur exemplar funcțional al CHS (*c2/c2 whp/whp*). Plantele erau sterile de parte bărbătească în încrucișările de soră și în auto-încrucișări și nu au produs pigmenți vizibili de flavonoide în nici unul din țesuturi, inclusiv polenul și semințele. Au fost utilizate practici genetice standard de câmp pentru a se asigura că nici un polen contaminat nu a atins mătasea plantelor cu polen alb. Suplimentar, blocul de polen alb a fost înconjurat cu o varietate de grăunte pigmentat, astfel, încât orice grăunte contaminat ar fi putut fi recunoscut imediat. Polenul alb mutant, de la 50 - 100 de plante a fost colectat din sacii de mătase (la porumb), unificat și divizat în două porțiuni. O porțiune a fost utilizată "așa cum este" pentru încrucișări, iar cealaltă a fost tratat într-un raport, de aproximativ 20:1 cu flavonoli uscați (fie quercetin, kampferol, fie un amestec în raport de 50:50 din cele două). Mătasea de polen alb preparată a fost polenizată, fie cu polen alb netratat, fie cu polen alb suplimentat cu flavonoli și introduse imediat într-un sac.

875

880

885

Spicele mature au fost recoltate la 45 de zile după polenizare. Încrucișările de polen alb au dat, în general, aproximativ 200 de grăunte per spic și acest număr a fost obținut pe cale de rutină în auto-încrucișările complementate pe cale biochimică. A fost efectuat un număr total de 45 de auto-încrucișări în prezența de flavonoli adăugați și toate (100%) au produs spice complet pline, în timp ce auto-încrucișările (45 de încercări) realizate în absența flavonoidelor au prezentat un set de semințe, mai mic decât 1% din cel normal.

890

895 Experimentele confirmă că flavonolii sunt necesari pentru funcția polenului după cum urmează: (i) metanol și extracte apoase de stigmat și polen din specia sălbatică pot restaura în întregime germinarea și creșterea tubului la polenul deficient în flavonoide; (ii) aceste extracte conțin aceiași flavonoli care au arătat activitate în încercările de restaurare a fertilității *in vitro* descrisă aici; (iii) ușurința de a salva germinarea polenului și de a restaura creșterea tubului la lungimea normală *in vitro* și un set complet de semințe *in vivo* este restrânsă la o clasă specifică de flavonoide, și anume, flavonol aglicon; (iv) concentrația eficientă de flavonol variază în funcție de mijloace structurale, dar mulți dintre compuși au indicat un efect pronunțat la nivele, mai mici decât $10 \mu\text{M}$, în limitele concentrațiilor de ordin fiziologic ale acestor compuși.

905 Flavonoidele sunt produse în mod virtual din toate clasele de plante, din crucea voinicului, mușchi și ferigă până la gimnosperme și angiosperme. Studiile anterioare de flavonoide au utilizat adesea ori țesuturi de frunze sau rădăcini din speciile herbarium; în consecință nu avem o bună indicație despre cât de larg răspândită este fenomenul de flavonoide la polen. Omniprezența lor în țesutul plantelor și faptul că 910 flavonoidele au fost identificate în extractele de polen de la diferite specii larg divergente, indică faptul că flavonoidele sunt un constituent universal al polenului. Majoritatea flavonolilor plantelor apar ca specii 3 - O - glicozilate (J.B., Harborne și C.A. Wiliame, 1988, în *Flavonoide, Progrese în cercetare din 1980* J.B. Harborne, Bd. (Chapman și Hail, Londra) capitolele 7, 8), și aceasta este forma predominantă în 915 polenul de petunia (O.Ceska și N.d. Styles, 1984, *Phytopchemistry* 23: 1822). Numai forma aglicon poate salva funcția polenului, ceea ce sugerează că, fie nivele scăzute nedetectabile de aglicon sunt în mod normal prezente, fie activitatea glicozidazei este necesară pentru a produce agliconii necesari fertilizării.

Polenul asigură punctul de acces natural manipulării în procesul de fertilizare. 920 Pierderea activității flavonolului care se produce în plante fertile condiționat de parte bărbătească (CMF) acționează ca un gametostat natural și nu ca un gametocid. Funcția bărbătească totală poate fi restaurată prin administrare externă de flavonol polenului deficient în flavonoide. În mod suplimentar față de identificarea factorului implicat într-o fertilizare mai ridicată a plantelor, un avantaj semnificativ al prezentei 925 invenției este dezvoltarea unui sistem steril de parte bărbătească reversibil pentru producerea de semințe hibride.

Revendicări

930 1. Metodă de reglare a fertilității plantelor, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde blocarea producerii flavonolilor sau a activității acestora la sediul localizării polenului, în scopul obținerii unei plante condiționat androsterile, urmată de refacerea activității flavonolilor, pentru a salva capacitatea de germinare și de creștere a polenului din plantă.

935 2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** blocarea producerii flavonolilor se realizează prin inhibarea producerii sau inactivarea unei enzime din ciclul de biosinteză a flavonolilor.

3. Metodă, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** enzima din ciclul de biosinteză al flavonolilor este selectată dintre flavonon-3-hidroxilază și 940 chalconsinază.

4. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** refacerea fertilității plantei condiționat androsterilă flavonoid-deficitară se realizează prin restabilirea producerii enzimelor definite în revendicarea 3, din ciclul de biosinteză a flavonolilor sau prin reactivarea acestora.

5. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** refacerea fertilității plantei condiționat androsterilă flavonoid-deficitară se realizează prin contactarea polenului sau a stigmatului plantei cu o cantitate de flavonol esențial pentru restaurarea fertilității.

945

6. Metodă, conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** flavonolul esențial pentru restaurarea fertilității este selectat dintre galangin, kaempferol, isorhamnetin, quercetin și morin.

950

Președintele comisiei de examinare: **chim. Gruia Amelia**

Examinator: **ing. Petrea Dana-Maria**

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/00;

C 12 N 15/29;

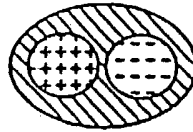
C 07 H 21/02;

C 07 H 21/04;

A 01 H 1/00;

PETUNIA

STERILITATE DOMINANTA

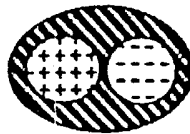


100 % POLEN STERIL

Fig.1A

FORUMB

STERILITATE REGRESIVA



100% POLEN STERIL

Fig.1B

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/00;
C 12 N 15/29;
C 07 H 21/02;
C 07 H 21/04;
A 01 H 1/00;

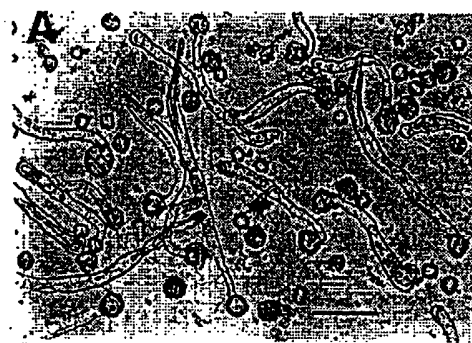


Fig.2A

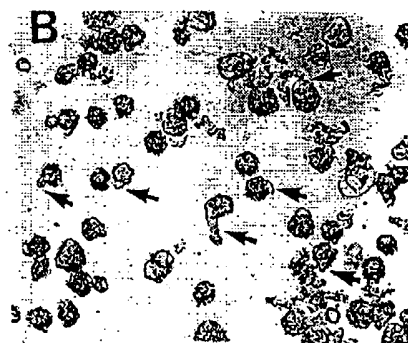


Fig.2B

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/00;
C 12 N 15/29;
C 07 H 21/02;
C 07 H 21/04;
A 01 H 1/00;

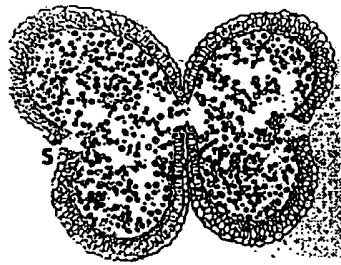


Fig. 3A

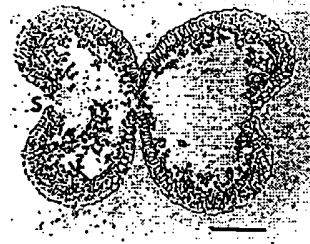


Fig. 3B

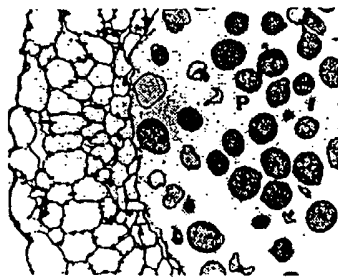


Fig. 3C



Fig.3D

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/00;
C 12 N 15/29;
C 07 H 21/02;
C 07 H 21/04;
A 01 H 1/00;

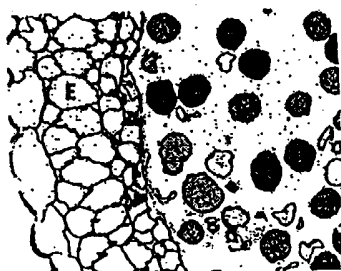


Fig. 3E

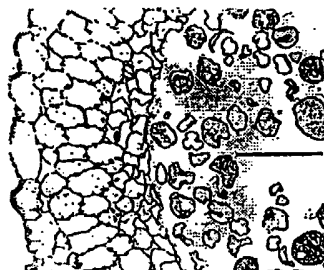


Fig. 3F

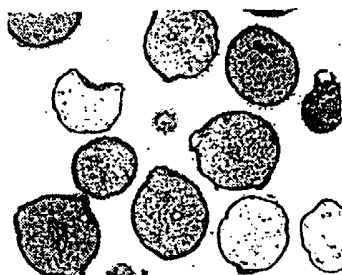


Fig. 3G

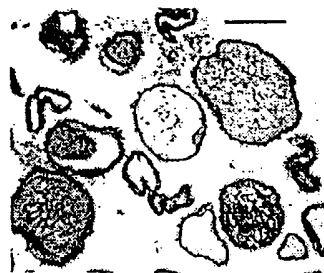


Fig. 3H

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/00;

C 12 N 15/29;

C 07 H 21/02;

C 07 H 21/04;

A 01 H 1/00;

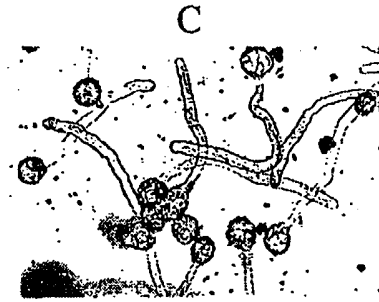


Fig. 4A

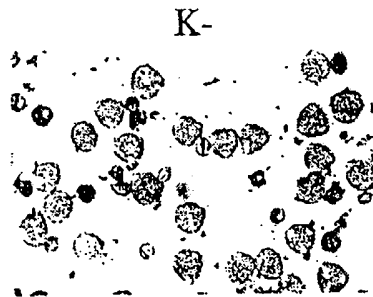


Fig. 4B

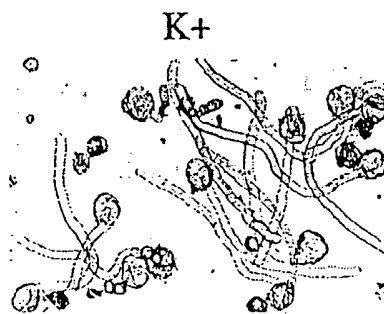


Fig. 4C

RO 116095 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/00;

C 12 N 15/29;

C 07 H 21/02;

C 07 H 21/04;

A 01 H 1/00;

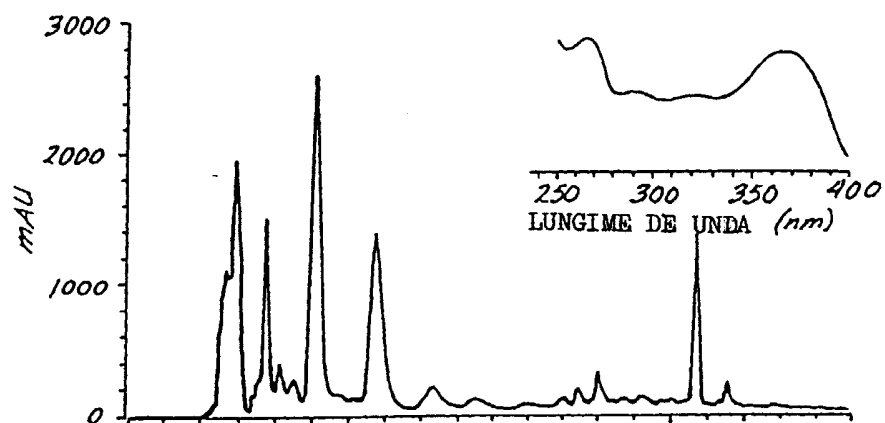


Fig. 5A

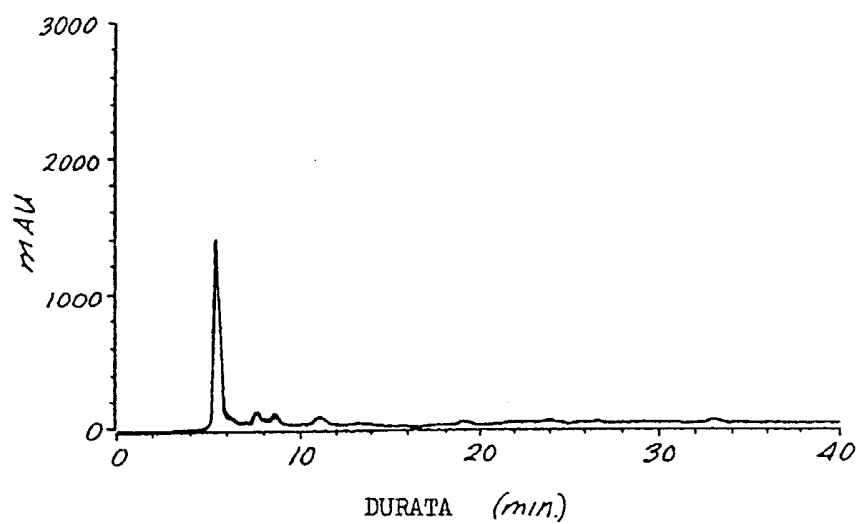


Fig. 5B

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/00;
 C 12 N 15/29;
 C 07 H 21/02;
 C 07 H 21/04;
 A 01 H 1/00;

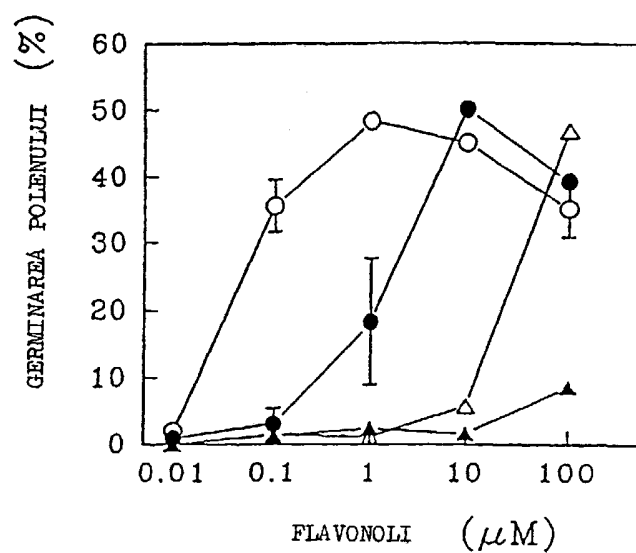


Fig. 6

